

12.05.99

5

## 日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 02 JUL 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1998年12月24日

出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第366818号

出願人  
Applicant(s):

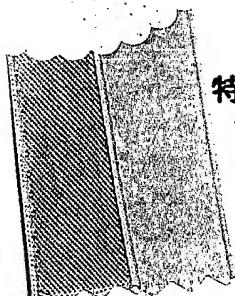
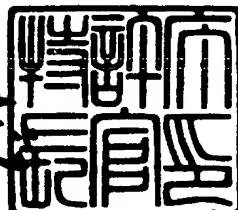
積水化学工業株式会社

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

佐佐木 建志



出証番号 出証特平11-3039392

【書類名】 特許願

【整理番号】 98P03692

【提出日】 平成10年12月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明の名称】 免疫測定試薬および免疫測定法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社  
内

【氏名】 横井 正之

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社  
内

【氏名】 赤峰 隆之

【特許出願人】

【識別番号】 000002174

【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社

【代表者】 西澤 進

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005083

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫測定試薬および免疫測定法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定試薬であって、

（a）酵素阻害剤と化学結合した上記抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）、

（b）上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素、および

（c）上記酵素の基質

からなることを特徴とする免疫測定試薬。

【請求項2】 酵素阻害剤が、該酵素に対する抗体であることを特徴とする請求項1記載の免疫測定試薬。

【請求項3】 酵素に対する抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項2記載の免疫測定試薬。

【請求項4】 試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定法であって、請求項1～3のいずれかに記載の免疫測定試薬と、上記試料とを混合し、抗原抗体反応と酵素反応を生じせしめ、生じた反応の度合いを測定することを特徴とする免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、免疫測定試薬および免疫測定法、特に、測定対象物質を高感度で測定可能な免疫測定試薬および免疫測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】

臨床検査の分野では、生体試料（血液、尿など）を用いて種々の疾患の診断を行っているが、これらを診断する方法として、種々の測定法が開発され利用されている。これらの測定法の代表的方法として、酵素反応を利用する生化学測定法や抗原抗体反応を利用する免疫測定法が挙げられる。近年においては、生体試料

中の成分を精度よく測定することが望まれ、特異性の高い抗原抗体反応を利用した免疫測定法が盛んに用いられている。

#### 【0003】

免疫測定法としては、免疫比濁法（TIA法）、ラテックス比濁法（LIA法）、酵素免疫測定法（EIA法）、放射免疫測定法（RIA法）などが挙げられ、目的に応じて使い分けされている。すなわち、生体試料中に含まれている成分の量が比較的多い場合は、TIA法やLIA法が使用されている。TIA法やLIA法では、測定する生体試料中の成分としては、例えば、C反応性タンパク質（CRP）、抗ストレプトリジン-O抗体（ASO）、フィブリン分解産物（FDP）などが挙げられ、生体試料中の濃度として、数ng/mL以上の場合に用いられる。これに対して、生体試料中に含まれる成分の量が微量の場合は、EIA法やRIA法が使用され、測定する生体試料中の成分としては、例えば、 $\alpha$ フェトプロテイン（AFP）に代表される癌マーカーやインシュリンに代表されるホルモンなどが挙げられ、生体試料中の濃度として、数ng/mL以下の場合に用いられる。

#### 【0004】

更に、近年、生体試料中の微量成分の測定が重要視され、EIA法やRIA法などが益々利用されてきている。しかしながら、EIA法やRIA法は、TIA法やLIA法が測定に要する時間が短く、操作が簡便で種々の自動分析装置（以下、汎用自動分析装置）へ適用可能であるのに比べて、反応時間が長く、操作法が煩雑で、かつ、使用する酵素や放射性同位元素の種類が種々あるため、特定の自動分析装置（以下、専用自動分析装置）へのみ適用される場合が多く、RIA法に至っては放射性同位元素を利用するため特定の施設が必要というような種々の問題がある。

#### 【0005】

近年、生体試料中の微量成分の測定においては、癌などの早期発見やエイズウイルスなどの感染初期を診断するため、超微量でも測定できるような方法が要望されている。超微量測定が可能な手法としては、LIA法やEIA法の変法または改良法など測定法自体の精度を上げる手法と、LIA法やEIA法などでは従

来からの方法で測定に使用する装置の性能を上げる手法に大別され、一部実用化されている。

#### 【0006】

測定法自体の精度を上げる手法としては、LIA法の不溶性担体を着色する方法（特開平1-214760号公報）、EIA法の抗原または抗体を標識する物質として酵素の代わりに、発光物質を利用する方法（特開平5-34346号公報）などが挙げられる。また、装置の性能を上げる手法として、特開平3-167475号公報に提案される方法がある。

#### 【0007】

しかしながら、これらのいずれの手法においても、汎用自動分析装置への適用は不可能であり、専用自動分析装置が必要という問題は解決されていない。専用自動分析装置が必要な理由は、上述のように、EIA法やRIA法に代表される微量成分の測定法は、反応時間、操作法、使用する酵素や放射性同位元素の種類などが測定法により種々異なるためであるが、これら以外の大きな理由として、現在、開発または上市されている微量成分の測定法は、B/F分離と呼ばれる操作（Bは反応により結合したもの、Fは未反応のもの）が必ず必要であるため、B/F分離操作のできない汎用自動分析装置へは適用できず、B/F分離操作のできる専用自動分析装置が必要となってくる。

#### 【0008】

最近、特開平5-249112号公報、特開平7-179495号公報などにみられるように、B/F分離の不必要的測定法も提案、開発されつつあるが、感度不足、測定時間が長いなどの問題により、専用自動分析装置が必要となったり、一部の汎用自動分析装置しか適用できないなどの問題がある。

#### 【0009】

一方、臨床検査の現場においては、超微量分析を行うには高価な専用自動分析装置が必要で、かつ、設置場所を確保しなければならないため、汎用自動分析装置による超微量成分の測定を望む声が大きい。

#### 【0010】

以上のように、現在、開発または上市されている超微量成分の測定は、ユーザ

一の強い要望があるにもかかわらず、B／F分離操作が必要なため、専用自動分析装置での測定に限られているという大きな問題点がある。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記問題点を解決するものであり、その目的は、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B／F分離を必要とせず簡便に測定できる免疫測定試薬および免疫測定法を提供することである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

以下、本明細書において、一文章中に、抗原（または抗体）という表現と、抗体（または抗原）という表現がある場合、括弧内は括弧内同士が対応し、括弧外は括弧外同士が対応しているものとする。

【0013】

本発明者らは、上記のような課題に鑑み、新規でかつ従来と同等もしくはそれ以上に感度が高く、かつ、汎用自動分析装置へ適用可能な免疫測定試薬および免疫測定法の開発のため、銳意研究を重ねた結果、B／F分離の必要がない微量成分の新規分析試薬および新規分析法を完成するに至った。

【0014】

すなわち、請求項1記載の発明は、試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定試薬であって、

- (a) 酵素阻害剤と化学結合した上記抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）、
- (b) 上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素、および
- (c) 上記酵素の基質

からなることを特徴とする免疫測定試薬である。

【0015】

請求項2記載の発明は、酵素阻害剤が、該酵素に対する抗体であることを特徴とする請求項1記載の免疫測定試薬である。

請求項3記載の発明は、酵素に対する抗体が、モノクローナル抗体であること

を特徴とする請求項2記載の免疫測定試薬である。

請求項4記載の発明は、試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定法であって、請求項1～3のいずれかに記載の免疫測定試薬と、上記試料とを混合し、抗原抗体反応と酵素反応を生じせしめ、生じた反応の度合いを測定することを特徴とする免疫測定法である。

#### 【0016】

##### 【作用】

以下、本発明の作用について詳細に述べる。

本発明においては、まず第1反応として、酵素阻害剤と化学結合した、生体試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）（以下、コンジュゲートという）と上記試料とが混合されることにより、上記抗体（または抗原）と試料中の抗原（または抗体）が反応することにより凝集反応が起こる。その凝集反応の結果、立体障害またはコンジュゲート中の酵素阻害剤のコンフォメーション変化が起こることにより、酵素阻害剤が失活し、酵素阻害作用が弱まる。

#### 【0017】

すなわち、酵素阻害作用は抗原抗体反応の凝集の度合いに応じて弱くなる。次に、第2反応として、酵素阻害剤はその活性に応じて、酵素の働きを阻害するので、系中に存在する酵素はその酵素阻害剤の活性に応じて失活する。

#### 【0018】

最後に、第3反応として、基質を添加することにより、酵素と基質の反応により発色するので、その度合いを測定することにより、酵素の失活の度合いを知ることができる。すなわち、最終的に基質により酵素活性を測定することにより、凝集の度合いを検出することができる。

#### 【0019】

以上を要約すると、測定対象物質とコンジュゲートが抗原抗体反応を起こして凝集することにより、コンジュゲート中の酵素阻害剤の酵素阻害作用が弱まる。しかる後、凝集の度合いを反映して該酵素阻害剤の作用により酵素が失活するので、系中の酵素の活性を基質を添加することにより測定すれば、系中の測定対象

物質の測定を行うことができる。

#### 【0020】

このように、本発明の免疫測定試薬および免疫測定法は、第1、第2、第3の反応が共に、生体試料中の抗原（または抗体）の量に依存した反応となるため、LIA法より高感度であり、かつ、EIA法などと違って、B/F分離の必要がない新規な免疫測定試薬および免疫測定法となる。

#### 【0021】

なお、上記説明における第1～第3の反応は説明のために3段階に分けたが、実際の測定に用いられる試薬は3種類に分けておく必要はなく、適当な条件を選ぶことにより、適宜組み合わせて1又は2種類としてもよいし、或いは、3種類以上としてもよい。

#### 【0022】

##### 【発明の実施の形態】

本発明により測定される測定対象物質としては、生体試料中の抗原または抗体が挙げられ、例えば、肝炎（B型、C型）由来抗原または抗体；HIV抗原または抗体；梅毒由来抗原または抗体； $\alpha$ -フェトプロテインに代表される癌マーカー；インシュリンに代表されるホルモン；オータコイドなどが挙げられるが、特にこれらに限定されない。

#### 【0023】

本発明に使用される酵素としては、基質と反応するものであれば特に限定されない。例えば、パーオキシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなどが挙げられる。酵素には、天然物から得られたもの、遺伝子工学的手法により得られたものなどあるが、いずれも使用可能である。

#### 【0024】

また、上記酵素を測定に使用する際は、適当な緩衝液などで希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、GOD緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。酵素の使用時の濃度としては、0.001～10IU/mLが好ましいが、使用する酵素の種類により異なるため、この範囲に限

定されるわけではない。

## 【0025】

次に、本発明に使用される基質は、使用する酵素と反応して吸光度変化を生じるものが用いられる。例えば、酵素としてパーオキシダーゼを使用する場合は基質として過酸化水素水にN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5ジメトキシアニリンを加えたもの、または、過酸化水素水にo-フェニレンジアミンやピロガロールを加えたもの、酵素としてアルカリフオスファターゼを使用する場合は基質としてp-ニトロフェニルリン酸、酵素としてβ-ガラクトシダーゼを使用する場合は基質としてo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドなどが挙げられるが、特に限定されず、目的・用途に応じて適宜選択される。

## 【0026】

上記の基質は、通常、化学合成により製造するか、または、市販されているものを使用する。測定に使用する際は適当な緩衝液などに溶解・希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、G.O.O.d緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。基質の使用時の濃度としては、0.1~1000mMが好ましいが、使用する基質の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

## 【0027】

次に、本発明に使用される酵素阻害剤としては、使用する酵素と結合して酵素活性を失活させるものであれば、特に、限定されず、例えば、ペプチド、抗体、フッ素化合物、イオウ化合物など、使用する酵素によりそれに対応した酵素阻害剤を用いる。

酵素阻害剤として、酵素に対する抗体（以下、抗酵素抗体という）を用いる場合は、抗体種としてはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよく、また、製造方法についても、公知の方法のいずれでもよい。ポリクローナル抗体であれば、ウサギ、山羊、めん羊などの動物に、使用する酵素を免疫して產生させればよい。モノクローナル抗体についても公知の方法を用いて得ることが

できる。

#### 【0028】

このようにして得られた抗体については公知のクロマトグラフィーなどによつて適宜精製してもよいし、場合によつては特別の精製をせずに用いてもよい。また、測定に使用する際は適當な緩衝液などで希釀して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、G o o d 緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。

#### 【0029】

酵素阻害剤の使用時の濃度としては、0.01～10mg/mLが好ましいが、使用する酵素阻害剤の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

#### 【0030】

本発明で用いる、酵素阻害剤と化学結合した上記抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）を製造する方法について説明する。

測定対象物質である抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素阻害剤の化学結合方法は、使用する抗体（または抗原）および酵素阻害剤の種類により異なるが、公知の方法の中から適宜最適の方法を選択すればよい。例えば、カルボキシル基をクロル炭酸エチル（またはブチル）と反応させ、活性を有する混合酸無水物に誘導し、相手方のアミノ基に反応させてアミド結合を形成する混合酸無水物法；カルボキシル基をカルボジイミド型縮合剤を使用して、活性エステル型に変えてから、相手方のアミノ基に反応させる活性エステル法；グルタルアルデヒドを用いる方法；過ヨウ素酸を用いる方法などが挙げられる。

#### 【0031】

本発明の免疫測定試薬を用いた免疫測定法においては、該免疫測定試薬と試料とを混合し、抗原抗体反応と酵素反応を生じせしめ、生じた反応の度合いを測定する。

上記反応の度合いを測定する方法としては、反応生成物の光学的性質を検出する方法が通常用いられる。光学的検出方法としては、最も汎用される吸光などに

による色調変化の検出の他に、蛍光、化学発光、生物発光などが挙げられる。光学的測定方法も波長測定の他、時間分解蛍光法なども挙げられるが特に限定されず、目的・用途に応じて適宜選択される。

## 【0032】

## 【実施例】

## 実施例1

## ①試薬作製

抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体（ウサギ由来ポリクローナル抗体）IgG 1 mg/m1（水溶液）の1m1に、SMCC（N-サクシイミジル-4-（N-マレイミドメチル）-1-カルボキシレート）4mg/m1（ジメチルホルムアミド溶液）の20μlを加えて、30℃で10分間攪拌し、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体とSMCCを結合させた。

## 【0033】

次いで、上記溶液に0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）を加えて全量10m1となるまで希釈し、この溶液をファルマシア社製、PD-10カラムでゲル濾過し、最初の3m1を捨て、次の1.5m1を分取し、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体とSMCC結合体（マレイミド結合抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体）を取り出した。

次に、上記マレイミド結合抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体画分1.5m1に、0.1mgのHCV（C型肝炎ウイルス）C-100抗原タンパクを添加し、30℃で60分間攪拌し、HCV C-100抗原タンパクと抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体コンジュゲートを生成し、試薬1とした。

## 【0034】

次に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを1mg/m1となるように、0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解したものを10m1調製し試薬2とした。

## 【0035】

更に、o-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド(ONPG)を、0.1重量%の濃度となるように、0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解したものをお10m1調製し試薬3とした。

## 【0036】

即ち、本発明の免疫測定試薬は、上記試薬1（酵素阻害剤である抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体と化学結合した抗原）、試薬2（上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素）および試薬3（上記酵素の基質）とからなるものである。

## 【0037】

## ②測定

C型肝炎患者の検体A, B, C、および標準血清0, 1, 2, 4, 8, 16 COI (CUT OFF INDEX) を検体とし、検体100μlに試薬1を100μl加え、37℃で10分放置し、その後、試薬2を200μl加え、37℃で10分放置し、さらに、試薬3を1000μl加えて37℃で10分放置した。その後、420nmの吸光度を測定し、標準血清で得られた吸光度値と標準血清のCOIとから検量線を作成し、検体A, B, Cで得られた吸光度値を上記検量線にあてはめて、検体A, B, CのCOIを求めた。その結果、検体Aは8COI、検体Bは4COI、検体Cは5COIであった。

## 【0038】

## 実施例2

## ①試薬作製

抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体 IgG 1mg/ml (水溶液) の1mlに、SMCC 4mg/ml (ジメチルホルムアミド溶液) の20μlを加えて、30℃で10分間攪拌し、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体とSMCCを結合させた。

## 【0039】

次いで、上記溶液に0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて全量10mlとなるまで希釈し、この溶液をファルマシア社製、PD-10カラムでゲル濾過し、最初の3mlを捨て、次の1.5mlを分取し、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体とSMCC結合体 (マレイミド結合抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体) を取り出した。

次に、上記マレイミド結合抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体画分1.5mlに、0.1mgのHCV (C型肝炎ウイルス) C-100抗原タンパクを添加し、3

0℃で60分間攪拌し、HCV C-100抗原タンパクと抗β-ガラクトシダーゼ抗体コンジュゲートを生成し、試薬1とした。

## 【0040】

次に、β-ガラクトシダーゼを1mg/mlとなるように、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解したものを10ml調製し試薬2とした。

## 【0041】

更に、o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドを、0.1重量%の濃度となるように、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解したものを10ml調製し試薬3とした。

## 【0042】

即ち、本発明の免疫測定試薬は、上記試薬1(酵素阻害剤である抗β-ガラクトシダーゼモノクローナル抗体と化学結合した抗原)、試薬2(上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素)および試薬3(上記酵素の基質)とからなるものである。

## 【0043】

## ②測定

C型肝炎患者の検体D, E, F、および標準血清0, 1, 2, 4, 8, 16 COI (CUT OFF INDEX) を検体とし、検体100μlに試薬1を100μl加え、37℃で10分放置し、その後、試薬2を200μl加え、37℃で10分放置し、さらに、試薬3を1000μl加えて37℃で10分放置した。その後、420nmの吸光度を測定し、標準血清で得られた吸光度値と標準血清のCOIとから検量線を作成し、検体D, E, Fで得られた吸光度値を上記検量線にあてはめて、検体D, E, FのCOIを求めた。その結果、検体Dは2COI、検体Eは15COI、検体Fは9COIであった。

## 【0044】

## 【発明の効果】

請求項1～3記載の免疫測定試薬は、上記の通りであり、本発明の免疫測定試薬を用いると、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B/F分離を必要としないので、簡便に測定できる。

本発明の免疫測定法は、上記の通りであり、本発明の免疫測定試薬を用いるので、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B／F分離を必要としないので、簡便に測定できる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B／F分離を必要とせず簡便に測定できる免疫測定試薬および免疫測定法を提供する。

【解決手段】 試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定試薬であって、

（a）酵素阻害剤と化学結合した上記抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）、

（b）上記酵素阻害剤により活性が阻害される酵素、および

（c）上記酵素の基質

からなることを特徴とする免疫測定試薬。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000002174]

1. 変更年月日 1990年 8月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号  
氏 名 積水化学工業株式会社